

# BAP テストを用いた抗酸化測定に関わる因子

Factors related to Biological antioxidant potential measurement using the BAP test

田中 佑季, 加藤 守匡, 寒河江 豊昭, 佐塚 正樹

Tanaka Yuki, Kato Morimasa, Sagae Toyoaki, Sazuka Masaki

山形県立米沢栄養大学

『紀要』

第5号 抜刷

2018年12月

## 【短報】

## BAPテストを用いた抗酸化測定に関わる因子

Factors related to Biological antioxidant potential measurement using the BAP test

田中 佑季<sup>1) 2)</sup>, 加藤 守匡<sup>2)</sup>, 寒河江 豊昭<sup>2)</sup>, 佐塚 正樹<sup>2)</sup>Tanaka Yuki<sup>1) 2)</sup>, Kato Morimasa<sup>2)</sup>, Sagae Toyoaki<sup>1)</sup>, Sazuka Masaki<sup>1)</sup><sup>1)</sup> 晃陽看護栄養専門学校

Koyo Vocational College of Nurses and Nutrition

<sup>2)</sup> 山形県立米沢栄養大学健康栄養学部

Yamagata Prefectural Yonezawa University of Nutrition Sciences

\* 田中佑季の1)は現所属, 2)は旧所属

【目的】近年イタリアの研究チームによって開発されたBiological Antioxidant Potentialテスト(以下BAPテスト)はその測定原理上, サンプルに食品を用いた場合, 抗酸化物質以外の物質が結果に影響を与える可能性がある。今回は阻害物質とその対策について検討をした。

【方法】各濃度のシュウ酸水溶液をサンプルとして測定した。加えて, 過去に抗酸化能を測定した葉菜類をサンプルにして, 抽出液の希釈に塩化カルシウム (CaCl<sub>2</sub>) 溶液を用いた。各サンプルはBAP法の定法に従って測定した。

【結果】シュウ酸はBAPテストにおいて見かけ上, 抗酸化能を示した。加えて, サンプルの希釈にCaCl<sub>2</sub>溶液を用いると, 見かけ上の抗酸化能が高くなった。

【結論】食品に含まれる一部の抗酸化物質以外の化学成分はBAPテストに影響を与える可能性があるため, この対策について今後検討する必要がある。

キーワード 抗酸化能 BAPテスト シュウ酸 キレート

## I 緒言

過去三年間, 本紀要にて, サクランボや緑茶飲料, モッテノホカなどのBiological Antioxidant Potential (BAP: 生物学的抗酸化能, 以下, 抗酸化能) の測定結果を報告してきた<sup>1-3)</sup>。食品に含まれる主な抗酸化物質として, 例えばビタミンC, ビタミンE, ビタミンAなどの栄養成分に加え, ポリフェノール類のような非栄養成分が挙げられる<sup>4-5)</sup>。

近年, イタリアの研究チームによって開発されたBAPテストは, 第二鉄(Fe<sup>3+</sup>)イオンを第一鉄(Fe<sup>2+</sup>)イオンへ還元することで, サンプルに含まれるすべての水溶性の抗酸化物質, 尿酸, アスコルビン酸, タンパク質, ビリルビンおよびポリフェノール類などの抗酸化力を総合的に示すことが可能な測定手

法である<sup>6)</sup>。

BAPテストの優れている点として, 抗酸化測定の定法であるDPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)測定法などと比べると, 測定が簡便であることと, 数値化された値を評価表と比べることで, 臨床に応用可能な点が挙げられる<sup>7)</sup>。

しかし, 測定原理に鉄イオンを利用することから, サンプルに含まれる抗酸化物質以外の物質と結びつく可能性があり, 多彩な化学物質の含まれるサンプルへの使用に耐え得る物かは十分に検討されているとは言えない。本報告では, 測定試薬に含まれる鉄を標的として, この阻害とその対策を検討した。

## Ⅱ 方法

### 1. 実験材料および機材

実験材料としてシュウ酸試薬とCaCl<sub>2</sub>試薬, ホウレンソウとウコギの抽出液を用いた. BAPテストには, フリーラジカル解析装置 FREE carpe diem (Diacron International社製) を用いた.

### 2. サンプルの調整とBAP測定

シュウ酸試薬は蒸留水を用いて, 1mM, 2.5mM, 5mM, 7.5mM, 10mM, 15mM, の濃度の水溶液を作成した. 各濃度のシュウ酸水溶液をサンプルとして, BAPテストの原理に基づき, BAPを測定した.

CaCl<sub>2</sub>は蒸留水を用いて, 10mMと1Mの濃度の水溶液を作成した. ホウレンソウとウコギは, 冷凍品を用いて, 以前に, 緑茶を測定した時のプロトコルに従い, 可食部50gを量り, サンプルとして調製した. 蒸留水を220g加えてミキサーにて破碎したサンプルは4℃, 3,000rpm, 5分間遠心して上清を得た. 更に上清は0.45 μmのフィルターでろ過して浮遊物を取り除いてBAP測定サンプルとした. 各サンプルはBAP測定を行うには濃度が濃すぎるため, 先に作成した1M又は10mMのCaCl<sub>2</sub>水溶液で希釈をした. 希釈されたサンプルをBAPテストの原理に基づき, BAPを測定した.

## Ⅲ 結果

シュウ酸水溶液のBAPテストの結果を表1及び図1に示した.

サンプル	濃度	BAP値 (μmol/l)	平均値 (μmol/l)
シュウ酸 水 溶 液	15mM	5788.2	4021.1
	10mM	3981.6	
	7.5mM	4001.4	3127.9
		3087.4	
	5mM	2116.8	2277.9
		2358.9	
	2.5mM	2357.9	1341.7
		1322.8	
	1mM	1360.6	703.3
		729.3	

表1 シュウ酸のBAPテスト結果

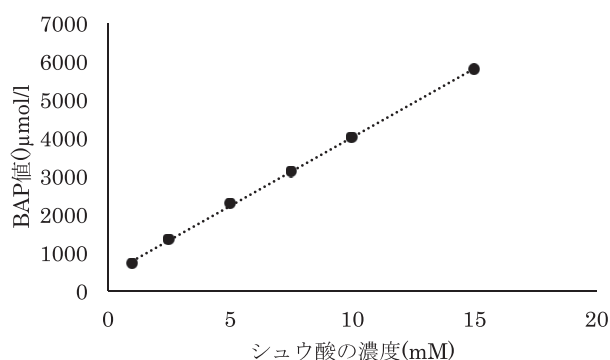


図1 シュウ酸のBAPテスト結果

図1より, BAPテストでは本来抗酸化能を持たないはずのシュウ酸が濃度依存的にBAP値を示すことを見いだした.

次に, ホウレンソウとウコギの抽出液の希釈にCaCl<sub>2</sub>を用いた時のBAPテストの結果を表2に示した.

サンプル	希釈液	希釈倍率	BAP値 (μmol/l)
ホウレンソウ	1M CaCl <sub>2</sub>	×2	3958.1
	10mM CaCl <sub>2</sub>	×2	3746.3
	DW	×2	3415.2
ウコギ	1M CaCl <sub>2</sub>	×2	5646.4
	DW	×2	5381.5
1M CaCl <sub>2</sub>			1747.8
10mM CaCl <sub>2</sub>			461.4

表2 希釈液にCaCl<sub>2</sub>を用いた時の  
ホウレンソウとウコギのBAPテスト結果

## Ⅳ 考察

今回使用したBAPテストの反応式を図2に示す

BAPテストの反応

(AT = 無色のチオシアン酸塩)

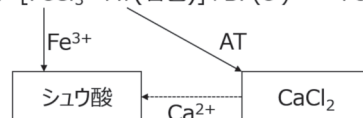
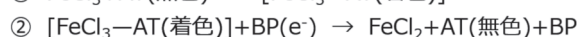
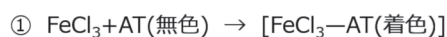


図2 BAPテストの反応

図2の①と②はウイスマーのホームページ上で公開されているBAPテストの反応式である<sup>6)</sup>。BAPテストは $\text{Fe}^{3+}$ とチオシアン酸塩(AT)が結びつくことで発色し、この $\text{Fe}^{3+}$ がサンプル中の抗酸化物質により $\text{Fe}^{2+}$ に還元することで発色が消えたときの差を比色定量したものであるが、今回検討した、シュウ酸は本来抗酸化能を持たないはずの物質だがBAP値を示した。これはシュウ酸に抗酸化能が有るのではなく、本来ATと反応すべき $\text{Fe}^{3+}$ がシュウ酸と金属錯体を形成する事により阻害されたことが原因と思われる<sup>8)</sup>。このため、シュウ酸を含むサンプルの希釈を鉄以外の金属分子を含む水溶液にすることでシュウ酸の影響を低減できないかと考えた。このBAPテストの反応を阻害するシュウ酸への対策として、 $\text{CaCl}_2$ 水溶液を用いた。これは図2で示した通り、あらかじめシュウ酸を多く含む食品の希釈に $\text{CaCl}_2$ を加えることで、シュウ酸が $\text{Fe}^{3+}$ に代わって $\text{Ca}^{2+}$ と反応することを期待した。サンプルにはシュウ酸の多い食品であるハウレンソウと過去の検討で高いBAP値を示したウコギの2種類の葉菜を用いた。意外な結果ではあるが、予想に反して $\text{CaCl}_2$ 溶液を用いたサンプルの方が高いBAP値を示し、その後 $\text{CaCl}_2$ 溶液を単体でサンプルとして用いたところ、1Mの $\text{CaCl}_2$ においてBAP値が示された。この原因としてシュウ酸の対策に用いた $\text{CaCl}_2$ がATを奪った可能性がある。

本検討で注目すべきは、BAPテストにおいて $\text{CaCl}_2$ が単体で見かけ上は抗酸化能を示すものの、1Mと言う極端な濃度を用いても結果に与える影響が大きいことが挙げられる。

もし、比例関係で反応しているとしたら、 $\text{CaCl}_2$ が10mM、BAP値461.4ならその100倍の1Mで計算上はBAP値46,140になるはずだが、表2から、 $\text{CaCl}_2$ が1MでBAP値1747.8が測定され計算上との差が1桁以上なので、比例関係ではない反応であると推測できる。1989年平井らの検討によると、アルミニウムの共沈反応におけるシュウ酸と亜鉛の処理において、濃度の高低に関わらず、処理効率が低下する現象について化学平衡の可能性を示唆している<sup>9)</sup>。本件等においても2種類の金属とシュウ酸を用いた点で共通しており、可能性の一つとして考慮する必

要がある。

シアン化合物は毒性が強いことが知られており、全シアンの定量法は日本工業規格に定められている<sup>10)</sup>、金属シアノ錯体の種類によって分解性が異なることが示唆されている<sup>11)</sup>。このため今回使用した $\text{CaCl}_2$ は $\text{FeCl}_2$ と比較したときの分子間力の差から、一部のATを奪った可能性がある。しかし、他の金属化合物をはじめとした化学物質によるシュウ酸の除去によって当初目的としていた抗酸化物質以外がBAPテストに与える影響を低減できる可能性がある。

## V 結論

BAPテストは水溶性の抗酸化物質を簡便に測ることのできる手法であるが、食品に含まれる化学物質は多岐にわたる。今後使用する化合物や量や添加のタイミングなどを検討し、エビデンスを重ねることで、食品を標的としたBAPテストの発展に寄与したい。

## 利益相反

本研究においては利益相反に該当するものはない。

## 参考文献

- 1) 田中佑季, 加藤守匡, 寒河江豊昭, 佐塚正樹, モッテノホカの抗酸化能(BAP), 山形県立米沢栄養大学『紀要』, 3, 13-16, 2017
- 2) 佐塚正樹, 寒河江豊昭, 加藤守匡, 田中佑季, サクラソウの抗酸化能(BAP), 山形県立米沢栄養大学『紀要』, 3, 7-10, 2016
- 3) 佐塚正樹, 寒河江豊昭, 加藤守匡, 田中佑季, 緑茶飲料の抗酸化力(BAP), 山形県立米沢栄養大学『紀要』, 1-2, 15-18, 2015
- 4) 中村成夫, 活性酸素と抗酸化物質の科学, 日医大医会誌, 9(3), 164-169
- 5) 大澤俊彦, 天然抗酸化物質の探索とその応用, 化学と生物『連載講座』, 37(9), 616-624, 1999
- 6) 株式会社ウイスマー, BAPテストにおける反応, [http://wismerll.co.jp/products/free\\_carpediem/index.html](http://wismerll.co.jp/products/free_carpediem/index.html), (2018年9月26日)

- 7) 大和孝子, 松岡伴実, 西山敦子, 平山隼人, 他,  
高濃度カテキン含有緑茶飲料がデイ年期女性の  
精神的ストレスに及ぼす影響, 中村学園大学・中  
村学園大学短期大学部研究紀要, 45, 173-181,  
2013
- 8) M. Taxiarchou, D. Panias, I. Douni, I. Pas-  
paliaris, et al. , Removal of iron from silica sand  
by leaching with oxalic acid, Hydrometallurgy,  
46, 215-227, 1997
- 9) 平井英二, 丁子哲治, 東田明弘, 林良茂, 有機  
酸・微量重金属混合系実験廃液の水酸化アルミ  
ニウムによる共沈処理: シュウ酸・亜鉛金剛溶  
液を例とした検討, 衛生科学, 35(1), 55-62, 1989
- 10) JIS K 0102:2016, 128-138
- 11) 輿水敏子, 高松和幸, 阿相敏明, 金子幹宏, 他,  
イオン電極法の実用化に関する研究(第6報)金属  
シアン錯塩の分解に対するEDTAの効果, 衛生科  
学, 20(6), 328-331, 1974